

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
7 septembre 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/64830 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12G 3/07, C12N 9/24
- (74) Mandataires : VANDEBERG, Marie-Paule etc.; Office Kirkpatrick, avenue Wolfers 32, B-1310 La Hulpe (BE).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/BE01/00033
- (81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 2 mars 2001 (02.03.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (30) Données relatives à la priorité : 2000/0174 3 mars 2000 (03.03.2000) BE
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : ETS. ROBERT STIERNON S.A. [BE/BE]; Rue des Ateliers 7, B-7850 Petit-Enghien (BE).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
- (72) Inventeur; et
- (75) Inventeur/Déposant (*pour US seulement*) : HENRY, Olivier [BE/BE]; Venelle Bruyère Sainte Anne, B-1300 Wavre (BE).
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHODS FOR PRODUCING OENOLOGICAL TANNINS AND ENZYMATIC COMPOSITION

(54) Titre : PROCEDES DE FABRICATION DE TANINS OENOLOGIQUES ET COMPOSITION ENZYMATIQUE

(57) Abstract: The invention concerns an enzymatic method for making oenological tannins starting with lumps of wood and an enzymatic method for transforming tannins into tannins for wine-making purposes. The inventive method comprises a step which consists in contacting the lumps of wood or tannins with an aqueous solution comprising a composition containing enzymes of the cellulase class. The invention also concerns an enzymatic composition mainly consisting of enzyme of the cellulase class for making oenological tannins, comprising an endocellulase activity, a xylanase activity a β -mannanase and/or α -amylase activity.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet un procédé enzymatique de fabrication de tanins oenologiques au départ de bois en morceaux ainsi qu'un procédé enzymatique de transformation des tanins en tanins à usage oenologique. Les procédés selon l'invention comportent une étape de mise en contact du bois en morceaux ou des tanins avec un bain aqueux comportant une composition comportant des enzymes de la classe des cellulases. L'invention a également pour objet une composition enzymatique comprenant principalement des enzymes de la classe des cellulases, pour la fabrication de tanins oenologiques, comprenant une activité endocellulase, une activité xylanase, une activité β -mannanase et/ou une activité α -amylase.

WO 01/64830 A1

PROCEDES DE FABRICATION DE TANINS OENOLOGIQUES ET
COMPOSITION ENZYMATIQUE.

La présente invention concerne un procédé enzymatique
5 de fabrication de tanins œnologiques au départ de bois en
morceaux, un procédé enzymatique de transformation de tanins
en tanins à usage œnologique, ainsi qu'une composition
enzymatique pour la fabrication de tanins œnologiques.

Selon le Codex œnologique international, le tanin
10 œnologique est retiré soit de la noix de galle, soit d'un
bois riche en tanin (châtaignier, chêne), soit des pépins de
raisin, etc. Le tanin est composé d'un mélange de
glucosides, d'acide ellagique, d'acide gallique, de
catéchol, etc.

15 ETAT DE LA TECHNIQUE

Les méthodes de préparation de tanins ont par le passé
essentiellement été basées sur des procédés d'extraction à
partir de produits végétaux.

Ainsi, US 4,490,405 utilise un mélange hydro-alcoolique
20 à proportions variables pour extraire des tanins du houblon.
Après récupération des tanins, l'éthanol est recyclé.

D'autres procédés comme EP 0 444 163 ou WO 99/49129
utilisent de l'eau à différentes températures entre 60 et
100° C pour traiter l'écorce d'arbre ou les particules de
25 bois en vue de l'extraction. Il est à noter que l'écorce
d'arbre ne peut fournir de tanins œnologiques.

Dans WO 99/21634, la température utilisée est encore
plus élevée (115° C) puisqu'on dévoile l'utilisation de
vapeur d'eau sous pression (0,3 MPa).

30 Ces procédés, dont la mise en œuvre reste complexe, ne
permettent pas d'obtenir des rendements très élevés.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

La présente invention a pour but de fournir un procédé d'extraction et de transformation des tanins par voie enzymatique, afin d'augmenter les rendements d'extraction, et de transformer enzymatiquement certaines molécules ayant des caractères astringents ou amers en des molécules gustativement plus acceptables.

L'invention a pour objet un procédé d'extraction de tanins oenologiques à partir de bois en morceaux, de préférence de la sciure, des copeaux de bois ou des mélanges des deux, que l'on met en contact par immersion avec un bain, de préférence aqueux ou hydro-alcoolique, qui comprend principalement une composition d'enzymes de la classe des hydrolases (classe 3 de l'union internationale de biochimie IUB), choisies parmi les enzymes de type cellulase (sous-classe 3.2). Ces enzymes sont également connues sous le nom de glucosidase.

Les enzymes sont, de préférence, choisies parmi les cellobiohydrolases, les endoglucanases, les β -glucosidases, les hemicellulases, les α -amylases, les xylanases, les β -mannanases, les endocellulases, etc., et les mélanges de ces enzymes, sans perdre de vue que ces enzymes présentent souvent des activités secondaires à côté de leur activité principale.

La composition enzymatique utilisée peut comprendre des enzymes de type exocellulaire ou endocellulaire.

Les enzymes peuvent être d'origine bactérienne, fongique ou de toute autre origine possible.

La composition enzymatique utilisée peut, en outre comprendre des enzymes de type lipase (sous-classe 3.1), et les mélanges de ces enzymes.

Une alternative à ce procédé consiste à solubiliser des tanins obtenus par une méthode classique d'extraction et de les traiter en phase aqueuse ou hydro-alcoolique avec la composition enzymatique décrite ci-dessus. Un autre objet de l'invention est donc un procédé de transformation enzymatique de tanins obtenus de manière classique.

L'invention a également pour objet une composition enzymatique comprenant principalement des enzymes de la classe des cellulases, présentant au moins une activité choisie parmi les activités endocellulase comprises entre $10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^9$ ECU (de préférence entre $30 \cdot 10^6$ et $0,3 \cdot 10^9$ ECU), les activités xylanase comprises entre $6 \cdot 10^6$ et $0,6 \cdot 10^9$ BXU (de préférence entre $20 \cdot 10^6$ et $0,2 \cdot 10^9$ BXU), les activités β -mannanase comprises entre $4 \cdot 10^6$ et $0,4 \cdot 10^9$ MNU (de préférence entre $10 \cdot 10^6$ et $0,1 \cdot 10^9$ MNU) et les activités α -amylase comprises entre $10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^9$ α TU (de préférence entre $30 \cdot 10^6$ et $0,3 \cdot 10^9$ α TU). Toutes ces activités sont exprimées par tonne de bois à traiter. L'invention a également pour objet les procédés d'extraction ou de transformation de tanins utilisant une composition d'enzymes telle que décrite ci-dessus.

Il s'est avéré que les procédés suivant l'invention permettent une hydrolyse des ellagitanins solubles, naturellement présents dans le bois, ainsi que d'une partie des ellagitanins liés aux polysaccharides pariétaux, et de diverses molécules aromatiques telles l'acide digallique ou les coumarines hétérosidiques.

Les procédés suivant l'invention permettent donc d'améliorer l'impression gustative des extraits de bois en éliminant une partie significative des composés indésirables (comme certains composés phénoliques) et en hydrolysant des formes jugées amères ou astringentes.

En fonction de l'utilisation de cellulases neutres ou acides, le pH est ajusté entre 3 et 8, de préférence entre 4 et 7. La température du bain est maintenue constante entre 20 et 90° C, de préférence entre 40 et 60° C. Le traitement
5 par immersion peut durer de 5 minutes à 2 semaines, de préférence entre 1 heure et 24 heures, en fonction du support choisi, du volume à traiter, du volume du bain, de la température et du pH.

10 Après ce traitement par immersion, le bain est filtré et le liquide est évaporé, de préférence lyophilisé.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

MATERIEL ET METHODE

15 1. Origine des échantillons de bois

Les échantillons sont obtenus à partir de bois de coeur duraminisé. Les échantillons à traiter (noix de galle, chêne, châtaignier, etc.) selon l'invention sont simplement séchés au séchoir (1 mois, 40° C, avec ventilation). Les
20 différents échantillons pris au hasard sont rabotés puis réduits en sciure par broyage dans l'azote liquide, avant d'être tamisés pour ne conserver que les particules de dimension inférieure à 250 µm. Les échantillons sont conservés après lyophilisation pour être analysés dans un
25 délai de 2 mois.

2. Réalisation des extraits et contrôle de leur composition

1 g de sciure (250 µm) est soumis à extraction par 100 ml de solvant (acétone/eau 7:3 en volume) pendant 12 h à température ambiante sur table d'agitation; l'extrait obtenu
30 est ensuite filtré sur membrane, lyophilisé et pesé.

100 µg d'extrait lyophilisé sont utilisés pour l'identification des ellagitannins majoritaires par un spectromètre de masse LSIMS.

1 mg de l'extrait est repris par du méthanol/eau (6:4) pour être analysée par HPLC couplée à un détecteur UV et à un spectromètre de masse LSIMS, selon le dispositif mis au point par Vivas et al. (1995). La méthode de séparation
5 HPLC est décrite dans le paragraphe suivant.

3. Dosage des composés phénoliques

3.1. Coumarines

Les coumarines sont quantitativement extraites à l'éther diéthylique à partir de 20 ml d'un extrait de bois.
10 La phase organique est évaporée à sec et le résidu repris par du méthanol. L'analyse HPLC est réalisée par un Varian 5060 couplé avec un détecteur spectrofluorimètre (Kontron SFM23/B) et colonne Ultrasphère ODS. Les coumarines pures ont été fournies par Extrasynthèse (aesculine, aesculétine,
15 scopolétine, ombelliférone, methyl-ombelliférone) et Sigma (sporalen). On observe les coumarines en fluorescence (excitation 425 nm et émission 325 nm).

3.2. Ellagitanins

3.2.1. Produits de référence

20 La vescalagine et la castalagine sont isolées et purifiées à partir du duramen de Q. robur, dans les conditions décrites par Vivas et al. (1995). Les différentes roburines (A-E) et la grandinine proviennent de Scalbert (INA/INRA Thierval-Grignon).

25 3.2.2. Séparation et dosage des ellagitanins par HPLC

La technique chromatographique de séparation et de dosage des ellagitanins est conforme à la méthode mise au point par Scalbert et al. (1990). Les extraits de bois sont analysés par HPLC sur colonne Ultrasphère ODS. La détection
30 est conduite à $\lambda=280$ nm.

3.2.3. Dosage des ellagitanins totaux

Estimation du taux de composés phénoliques totaux

L'estimation de la richesse des extraits de bois en composés phénoliques totaux est réalisée soit par la méthode
5 utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, soit par la mesure de l'absorbance à 280 nm des extraits dilués au 1/100 (Vivas et al., 1993). Ces deux méthodes donnent des résultats comparables mais non spécifiques des ellagitanins.

Réaction d'oxydation à l'acide nitreux

10 Dans cette méthode proposée par Bate-Smith (1972), les esters de l'acide hexahydroxyphénique et du glucose sont oxydés par l'acide nitreux sous azote. La réaction conduit à une coloration bleue que l'on mesure à 600 nm. Les résultats sont estimés en mg/g d'équivalent castalagine
15 ($\epsilon_{600\text{nm}}$: 983 g⁻¹).

Dégradation acide

La méthode proposée est adaptée de celle mise au point par Peng et al. (1991). Elle est basée sur l'hydrolyse
acide des ellagitanins, suivi d'un dosage par HPLC de
20 l'acide ellagique libéré. Les résultats sont exprimés en mg/g d'équivalent castalagine, en considérant qu'une mole de castalagine donne dans ces conditions une mole d'acide ellagique (Peng et al., 1991).

4. Extraction et dosage des polysaccharides

25 4.1. Etude de la fraction polysaccharide des échantillons témoins et traités

4.1.1. Extraction des polysaccharides

139 g de sciure sèche sont mis à macérer 72 h dans de l'eau, sur table d'agitation à température ambiante. La
30 solution est ensuite filtrée puis centrifugée. L'extrait est alors concentré jusqu'à 500 ml.

4.1.2. Isolement des polysaccharides

Les extraits subissent 3 précipitations (une à 1:9 d'eau/éthanol à 95 % vol., deux à 1:5 du même mélange). La précipitation est conduite à 3° C pendant 12 h. Ensuite les
5 fractions sont lyophilisées.

4.1.3. Caractérisation partielle

Le précipité présente un aspect floconneux de couleur très pâle, légèrement gris, qui est probablement un complexe avec les ellagitannins dont il est difficile d'isoler la
10 fraction polysaccharidique.

4.1.4. Dosage par méthode chimique

Dosage des polysaccharides neutres (Pn)

Les polysaccharides neutres sont dosés par la méthode au phénol sulfurique. La densité optique est lue à 490 nm et
15 les résultats sont exprimés en mg/l d'équivalent glucose.

Dosage des polysaccharides acides (Pa)

Les polysaccharides acides sont dosés par la méthode au métaphénylphénol. La densité optique est mesurée à 520 nm et les résultats sont exprimés en mg/l d'équivalent acide
20 galacturonique.

4.2. Extraction et dosage des polysaccharides du bois

1 g de copeaux est mis à macérer 24 h dans l'eau à 20° C sur table d'agitation. La solution est collectée par filtration et centrifugée. La sciure récupérée est alors
25 séchée et mise à macérer une nouvelle fois dans une solution de soude à 5 % dans les mêmes conditions. La solution alcaline est également collectée par filtration et centrifugée. Puis les deux catégories d'extrait (eau et soude) sont supplémentées en éthanol à 95 % à raison 1:5 en
30 volume. Les polysaccharides sont alors collectés par

centrifugation et repris par de l'eau distillée à 60° C. Le dosage des Pn est réalisé au phénol sulfurique et les Pa au métaphénylphénol. Les solutions de référence sont respectivement une solution aqueuse à 100 mg/l de glucose et
5 50 mg/l d'acide galacturonique pour Pn et Pa.

EXEMPLES

Exemple 1

Dans une cuve contenant 1.000 kg de sciure de chêne, on
10 ajoute 5.000 l d'eau et 5 kg de composition enzymatique présentant une activité d'endocellulase de $0,1 \cdot 10^9$ ECU, de xylanase de $0,18 \cdot 10^9$ BXU, de β -mannanase de $36 \cdot 10^6$ MNU et d' α -amylase de $0,21 \cdot 10^9$ α TU. On ajuste le pH à 5,0 avec de l'acide citrique et on élève la température à 60° C. Après
15 un traitement de 24 h, la cuve est vidée et le liquide est filtré puis lyophilisé.

Après ce traitement, les principaux groupes de composés ont été fractionnés et les différentes fractions ont été comparées par rapport à un témoin non traité.

20 Pour réaliser ce fractionnement, l'extrait du bois de chêne est évaporé à sec. L'extrait sec obtenu est repris par un volume d'eau, sous agitation pendant 2 heures à 30° C. La fraction insoluble obtenue comporte les lignines. La fraction soluble est à nouveau évaporée à sec. L'extrait
25 sec obtenu est alors repris par un volume d'un mélange éthanol/eau (9:1 en volume) et conservé 12 h à 4° C. La fraction insoluble obtenue comporte les polysaccharides. La fraction soluble quant à elle comporte les ellagitannins. Dans la sciure traitée, l'extrait sec est de 4,2 % en poids
30 par rapport au bois, contre 12,3 % en poids pour le témoin de bois non traité. Les pourcentages en poids de chacune des trois fractions par rapport à l'extrait sec sont repris dans le tableau I.

Tableau I

	Ellagitanins	Polysaccharides	Lignines
Témoin	60 %	30 %	10 %
Traité suivant l'invention	35 %	50 %	15 %

Cet essai a permis de mettre en évidence une hydrolyse des ellagitanins, parallèlement avec une augmentation relative de la teneur en polysaccharides, dans l'extrait sec.

Ces différentes fractions ont ensuite été soumises à des dosages plus précis, mettant en évidence une diminution des matières sèches extractibles, des ellagitanins, des proanthocyanidines, et des coumarines glucosylées (voir tableau II).

Tableau II

Résultats en mg/g de sciure	Témoin	Traité suivant l'invention
Extrait sec	123	42
Ellagitanins	54	21
Proanthocyanidines	0,62	0,12
Coumarines : glucosylées (aesculine + scopoline)	5,7	1,4
aglucones (aesculétine + scopolétine)	1,3	6,8

Une augmentation substantielle des polysaccharides a également été constatée dans un autre essai où le dosage a permis de distinguer entre les polysaccharides Pn et Pa (voir tableau III).

Tableau III

	Polysaccharides solubles (mg/g de sciure)	
	Neutres (Pn)	Acides (Pa)
Témoin	370	25
Traité suivant l'invention	625	48

Le traitement permet donc d'éliminer certaines substances jugées indésirables de par leur caractère astringent (comme la castalagine) ou amer (comme l'aesculine) et de les transformer en molécules gustativement neutres (comme l'acide gallique, l'acide ellagique et dans une moindre mesure l'aesculétine), ainsi que d'augmenter la teneur en polysaccharides (ce qui tendra à donner plus de rondeur et de gras au vin élevé en présence de cet extrait de bois).

Une série de tests de dégustation ont également été réalisés (voir tableau IV). Ceux-ci confirment les expériences précédentes dans le sens où la quantité d'extrait de bois nécessaire pour percevoir les caractères amers ou astringents sont beaucoup plus élevées dans le cas de sciure traitée enzymatiquement selon l'invention par rapport à la sciure non traitée.

Tableau IV

Comparaison des seuils gustatifs de perception en fonction du mode de traitement, indiquant le seuil de perception gustatif ($S_{50\%}$) * en mg/l de solution modèle de vin		
	Astringence	Amertume
Sciure non traitée	130	110
Sciure traitée Selon l'invention	420	350

* $S_{50\%}$ concentration à partir de laquelle une substance est perçue par 50 % des dégustateurs.

Exemple 2

On remplace 1.000 kg de sciure de chêne par 1.000 kg de sciure de châtaignier dans 5 000 l d'eau et on procède avec
5 5 kg de la composition enzymatique décrite à l'exemple 1.

Des extraits de châtaignier (riches en acide digallique issu de l'hydrolyse des gallotanins) de diverses provenances ont été soumis (voir tableau V) à une hydrolyse enzymatique par la préparation enzymatique selon l'invention.

10 Il en ressort une hydrolyse quasi totale de l'acide digallique en acide gallique, ainsi qu'une forte diminution des coumarines glucosylées (les coumarines aglucones étant insipides).

Ces résultats revêtent une grande importance car ils
15 montrent la possibilité de valoriser une essence peu employée à ce jour. Le châtaignier présente en effet toutes les qualités requises en oenologie, mais est très peu employé à cause de l'amertume importante qu'il présente.

Le traitement enzymatique réduit très fortement cette
20 amertume et permet d'envisager une utilisation plus importante du châtaignier, pour des usages particuliers où le chêne n'est pas approprié. Ainsi, pour l'élevage d'alcools blancs, le châtaignier est tout indiqué parce que ne possédant pas d'ellagitanins, il modifiera peu le goût de
25 fruit de l'alcool, et ne possédant pas de pigments, il ne colorera pas non plus l'alcool à traiter.

Tableau V

Valorisation du châtaignier par l'utilisation de la préparation enzymatique suivant l'invention		
Résultats en mg/g de sciure	Témoin	
	Acide digallique	Coumarines glucosylées
Châtaignier Dordogne	10,2	8,3
Châtaignier Dauphiné	9,3	5,7
Châtaignier Gironde	4,6	10,2
	Traité suivant l'invention	
	Acide digallique	Coumarines glucosylées
Châtaignier Dordogne	< 0,1	2,3
Châtaignier Dauphiné	0,4	1,7
Châtaignier Gironde	0,8	3,5

R E V E N D I C A T I O N S

1.- Procédé de fabrication de tanins oenologiques à
5 partir de bois en morceaux, caractérisé en ce qu'il comporte
une étape de mise en contact du bois par immersion avec un
bain comportant une composition enzymatique essentiellement
de la classe des cellulases.

2.- Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en
10 ce que la composition enzymatique comporte une ou plusieurs
enzymes choisies parmi les cellobiohydrolases, les
endoglucanases, les β -glucosidases, les hemicellulases, les
 α -amylases, les xylanases, les β -mannanases, les
endocellulases, et les mélanges de ces enzymes.

15 3.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications
1 et 2, caractérisé en ce que la composition enzymatique
présente une ou plusieurs activités choisies parmi les
activités endocellulase comprises entre $10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^9$ ECU,
de préférence entre $30 \cdot 10^6$ et $0,3 \cdot 10^9$ ECU, par tonne de bois
20 à traiter, les activités xylanase comprises entre $6 \cdot 10^6$ et
 $0,6 \cdot 10^9$ BXU, de préférence entre $20 \cdot 10^6$ et $0,2 \cdot 10^9$ BXU, par
tonne de bois à traiter, les activités β -mannanases
comprises entre $4 \cdot 10^6$ et $0,4 \cdot 10^9$ MNU, de préférence entre
 $10 \cdot 10^6$ et $0,1 \cdot 10^9$ MNU, par tonne de bois à traiter et les
25 activités α -amylases comprises entre $10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^9$ α TU, de
préférence entre $30 \cdot 10^6$ et $0,3 \cdot 10^9$ α TU par tonne de bois à
traiter.

4.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications
précédentes, caractérisé en ce que la mise en contact du
30 bois avec le bain est effectuée par immersion durant une
période variant de 5 min à 2 semaines.

5.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications
précédentes, caractérisé en ce que le pH du bain est compris
entre 3 et 8.

6.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la température du bain est comprise entre 20 et 90° C.

5 7.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le bois en morceaux est sous forme de sciure.

8.- Procédé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le bois en morceaux est
10 sous forme de copeaux.

9.- Procédé de transformation de tanins obtenus par extraction par solvant, en tanins oenologiques, caractérisé en ce qu'il comporte une mise en contact des tanins avec un bain comportant une composition enzymatique essentiellement
15 de la classe des cellulases.

10.- Procédé suivant la revendication 9, caractérisé en ce que la composition enzymatique comporte une ou plusieurs enzymes choisies parmi les cellobiohydrolases, les endoglucanases, les β -glucosidases, les hemicellulases, les
20 α -amylases, les xylanases, les β -mannanases, les endocellulases, et les mélanges de ces enzymes.

11.- Composition enzymatique pour la fabrication de tanins oenologiques, comprenant principalement des enzymes de la classe des cellulases, présentant une ou plusieurs
25 activités choisies parmi les activités endocellulase comprises entre $10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^9$ ECU, de préférence entre $30 \cdot 10^6$ et $0,3 \cdot 10^9$ ECU, par tonne de bois à traiter, les activités xylanase comprises entre $6 \cdot 10^6$ et $0,6 \cdot 10^9$ BXU, de préférence entre $20 \cdot 10^6$ et $0,2 \cdot 10^9$ BXU, par tonne de bois
30 à traiter, les activités β -mannanases comprises entre $4 \cdot 10^6$ et $0,4 \cdot 10^9$ MNU, de préférence entre $10 \cdot 10^6$ et $0,1 \cdot 10^9$ MNU, par tonne de bois à traiter et les activités α -amylases comprises entre $10 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^9$ α TU, de préférence entre $30 \cdot 10^6$ et $0,3 \cdot 10^9$ α TU, par tonne de bois à traiter.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/BE 01/00033

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12G3/07 C12N9/24

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12G C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, WPI Data, FSTA, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 356 641 A (BENNING JAN ET AL) 18 October 1994 (1994-10-18) column 3, line 57-60; example 1 ---	1-11
X	WO 98 44189 A (WHITMIRE DAVID R) 8 October 1998 (1998-10-08) page 3, line 12-25 page 5, line 18-23 page 6, line 1-11 page 19, line 4-6 ---	1-11
P, X	WO 00 40382 A (ROBERT STIERNON S A N V ETS ;HENRY OLIVIER (BE)) 13 July 2000 (2000-07-13) page 19, line 11-17; examples 1,2 --- -/--	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 2001

Date of mailing of the international search report

22/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/BE 01/00033

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DD 292 864 A (WTZ HOLZVERARBEITENDE IND) 14 August 1991 (1991-08-14) the whole document ----	1-6,8,11
X	DATABASE WPI Week 197751 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1977-91378Y XP002138537 & JP 50 024405 A (JAPAN PLYWOOD TECH), 15 March 1975 (1975-03-15) abstract ----	1,2,4-6, 8,11
X	EP 0 307 071 A (YISSUM RES DEV CO) 15 March 1989 (1989-03-15)	9,10
A	page 7, line 15-34; claims 12,20; examples 4-6 ----	1-8,11
A	EP 0 727 493 A (KIKKOMAN CORP) 21 August 1996 (1996-08-21) examples 1-3 -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 01/00033

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5356641 A	18-10-1994	AU 6795894 A WO 9426868 A	12-12-1994 24-11-1994
WO 9844189 A	08-10-1998	AU 6792198 A	22-10-1998
WO 0040382 A	13-07-2000	EP 1020264 A AU 1850500 A	19-07-2000 24-07-2000
DD 292864 A	14-08-1991	NONE	
JP 50024405 A	15-03-1975	JP 926025 C JP 52047004 B	22-09-1978 29-11-1977
EP 0307071 A	15-03-1989	IL 82980 A AT 153062 T AU 1830988 A DE 3855907 D DE 3855907 T DK 352088 A ES 2104554 T GR 3024464 T JP 2186985 A	16-09-1991 15-05-1997 16-02-1989 19-06-1997 22-01-1998 25-12-1988 16-10-1997 28-11-1997 23-07-1990
EP 0727493 A	21-08-1996	JP 8283257 A US 5814494 A	29-10-1996 29-09-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l' . Internationale No
PCT/BE 01/00033

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12G3/07 C12N9/24

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12G C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, WPI Data, FSTA, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 356 641 A (BENNING JAN ET AL) 18 octobre 1994 (1994-10-18) colonne 3, ligne 57-60; exemple 1 ---	1-11
X	WO 98 44189 A (WHITMIRE DAVID R) 8 octobre 1998 (1998-10-08) page 3, ligne 12-25 page 5, ligne 18-23 page 6, ligne 1-11 page 19, ligne 4-6 ---	1-11
P, X	WO 00 40382 A (ROBERT STIERNON S A N V ETS ;HENRY OLIVIER (BE)) 13 juillet 2000 (2000-07-13) page 19, ligne 11-17; exemples 1,2 --- -/--	1-11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 juin 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/06/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Koch, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/BE 01/00033

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DD 292 864 A (WTZ HOLZVERARBEITENDE IND) 14 août 1991 (1991-08-14) le document en entier ---	1-6, 8, 11
X	DATABASE WPI Week 197751 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1977-91378Y XP002138537 & JP 50 024405 A (JAPAN PLYWOOD TECH), 15 mars 1975 (1975-03-15) abrégé ---	1, 2, 4-6, 8, 11
X	EP 0 307 071 A (YISSUM RES DEV CO) 15 mars 1989 (1989-03-15) page 7, ligne 15-34; revendications 12, 20; exemples 4-6 ---	9, 10
A		1-8, 11
A	EP 0 727 493 A (KIKKOMAN CORP) 21 août 1996 (1996-08-21) exemples 1-3 -----	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Descriptive Internationale No

PCT/BE 01/00033

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5356641 A	18-10-1994	AU 6795894 A WO 9426868 A	12-12-1994 24-11-1994
WO 9844189 A	08-10-1998	AU 6792198 A	22-10-1998
WO 0040382 A	13-07-2000	EP 1020264 A AU 1850500 A	19-07-2000 24-07-2000
DD 292864 A	14-08-1991	AUCUN	
JP 50024405 A	15-03-1975	JP 926025 C JP 52047004 B	22-09-1978 29-11-1977
EP 0307071 A	15-03-1989	IL 82980 A AT 153062 T AU 1830988 A DE 3855907 D DE 3855907 T DK 352088 A ES 2104554 T GR 3024464 T JP 2186985 A	16-09-1991 15-05-1997 16-02-1989 19-06-1997 22-01-1998 25-12-1988 16-10-1997 28-11-1997 23-07-1990
EP 0727493 A	21-08-1996	JP 8283257 A US 5814494 A	29-10-1996 29-09-1998